Aus der Hautklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Schneider

Lymphozytenkulturen bei blasenbildenden Dermatosen mit besonderer Berücksichtigung der Pemphigusgruppe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Stefan Lang
aus Kunbaja/Ungarn

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0052

Aus der Hautklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Schneider

Lymphozytenkulturen bei blasenbildenden Dermatosen mit besonderer Berücksichtigung der Pemphigusgruppe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Stefan Lang
aus Kunbaja/Ungarn

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Tronnier
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Schneider

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Zum Problem der Lymphozyten-transformation 2

1) Die Abstammung der transformierten Lymphozyten 2

2) Die Entwicklung der transformierten Lymphozyten 3

3) Die Ursache der Mitoseinduktion 4

4) Die Biochemie der Lymphozyten-transformation 5

III. Methode 6

Konstruktion des "Dermovac" 8

Vorgang des Blasenziehens 9

IV. Ergebnisse und Diskussion 1 2

Kasuistik 21

1) Gesunde Kontrollpersonen 21

2) Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring 27

3) Patientengruppe mit Porphyria cutanea tarda 28

4) Patientengruppe mit Pemphigus 30

Vergleichende Diskussion 34

V. Zusammenfassung 38

VI. Literaturverzeichnis 39

I. Einleitung

Nowell (1) beobachtete 1960 erstmals, daß sich normale menschliche Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen charakteristisch verhalten.
Damit hatte er eine neue Arbeitsmethode in die Medizin eingeführt, deren Tragweite anfangs wohl nicht zu übersehen war. Die Erscheinung der Lymphozytentransformation, wie sie später benannt wurde, erwies sich als so bedeutungsvoll, daß sie heute für sehr heterogene Untersuchungs- und Forschungsarbeiten als Grundlage dient. Allein dieser Entdeckung hat die Humangenetik ihre raschen Fortschritte zu verdanken. Sie führte zu neuen Therapievorstellungen bei der Behandlung der aplastischen Anämie und Panmyelophthise (2). Anhand der Lymphozytentransformation können Aussagen gemacht werden über die Histokompatibilität bei Gewebs- und Organtransplantationen (3).
Ferner scheint die Methode der Lymphozytentransformation einen wichtigen Beitrag zur Klärung einer allergischen Reaktionslage von Organismen darzustellen.
In dieser Arbeit soll über die Ergebnisse von Lymphozytenkulturen bei gesunden Kontrollpersonen, bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring, bei Patienten mit Porphyria cutanea tarda und mit Pemphigus berichtet werden.
Insbesondere soll geprüft werden, ob die Lymphozytentransformation als Test für die Sensibilisierung eines Patienten, speziell als Beweis für die von mehreren Autoren in letzter Zeit geforderte Autosensibilisierung bei Pemphigus vulgaris und Alterspemphigus, zu verwerten ist.

II. Zum Problem der Lymphozytentransformation

Als Nowell (1) bei Separationsversuchen mit Erythrozyten Blutkulturen Phytohämagglutinin (PHA) zusetzte, kam es zu gehäuften Mitosen bei normalen menschlichen Leukozyten. PHA ist ein Extrakt aus Phaseolus vulgaris, einer Bohnenart. Die Aufbereitung erfolgt in folgender Weise: die Bohnen werden gewaschen, homogenisiert und mit physiologischer Kochsalzlösung zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abpipettiert, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und filtriert (4). Die lymphozytenstimulierende Wirkung kann von der hämagglutinierenden abgetrennt werden (5). Den mitogenen Effekt von PHA konnten auch Gropp und Fischer (6) bestätigen.
Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen erhoben sich 4 Fragen:

1) Die Abstammung der transformierten Lymphozyten

Nach Astaldi (4) und Robbins (7) handelt es sich bei der Lymphozytentransformation abstammungsmäßig um kleine pyroninpositive Lymphozyten, die noch eine potentielle Teilungsfähigkeit besitzen. Die Mehrzahl der Hämatologen hielt den kleinen Lymphozyten lange Zeit für das Endprodukt der lymphatischen Entwicklungsreihe. Heute wird der kleine Lymphozyt als eine noch undifferenzierte, pluripotente Zelle des RES oder des hämatopoetischen Systems angesehen (4). Die durch PHA angeregte Transformation des Lymphozyten ist eine Art Rückdifferenzierung zu einer Stammzelle des lymphozytären Systems überhaupt (4). Es kommt zur Aktivierung von Zellen, die in einer Art Sporenform vorliegen. Der kleine Lymphozyt kann also nicht mehr als endgültig differenzierte Zelle, sondern als eine Zellform, der in vitro eine morphogenetische Transformations- und Modulationsfähigkeit zukommt, angesehen werden (6).

2) Die Entwicklung der transformierten Lymphozyten

Nach Sauli und Astaldi (8) ist die Lymphozytentransformation an bestimmte Gesetzmäßigkeiten unter gleichen Kulturbedingungen gebunden. Der Gipfel der Mitoseaktivität liegt um den dritten Tag. Nach dem fünften bis siebten Tag der Kultivierung gehen diese Zellen aus Gründen der Überalterung, der toxischen Wirkung von Stoffwechselprodukten und des Mangels an Nährstoffen zugrunde.
Bei gesunden Erwachsenen liegt die Transformationsquote unter PHA - Einwirkung zwischen 76 und 92 %, im Mittel bei 84 %. Der Mitoseindex liegt zwischen 1 - 2,4 %, im Mittel bei 1,6 % (9).
Die Lymphozytentransformation kann durch bestimmte dem Kulturmedium zugesetzte heterogene Substanzen gehemmt werden. Verschiedentlich wird die Hemmwirkung von Cortisonderivaten auf die mitotische Proliferation hervorgehoben, von anderer Seite wieder bestritten (6, 10). Stefani und Oester (11) fanden eine Hemmwirkung durch Prednisolon, wenn das Corticoid dem Kulturmedium 24 Stunden vor Zugabe von PHA zugesetzt wird. Wurde das Corticoid nach PHA-Zugabe dem Kulturmedium beigefügt, dann war dieser Hemmeffekt weit geringer.
Einigkeit besteht darüber, daß durch Chlorochin die Lymphozytentransformation unterbrochen werden kann (12). Auch verschiedene Arzneimittel (13) und Viren (14) üben in vitro eine Inhibitorwirkung auf PHA - stimulierte Lymphozyten aus.

3) Die Ursache der Mitose - Induktion

Im Schrifttum werden drei Ursachen diskutiert, die bei Kulturlymphozyten zu Mitosen führen sollen. Entweder hemmt, beziehungsweise neutralisiert PHA einen antimitotischen Faktor im Blut, oder es besteht die Möglichkeit, daß PHA durch seine hämagglutinierende Fähigkeit allein Mitosen auslöst (5, 15). Beide Erklärungen werden, da sie nicht experimentell belegt sind, als unwahrscheinlich angesehen.
Witkowski und Heine (16) halten die folgende Betrachtungsweise des Problems für reell.
Man kann die Stimulation von Blutlymphozyten in vitro als Modell einer Antigen - Antikörperreaktion ansehen. Tatsächlich ähnenln die in vitro transformierten Lymphozyten zytomorphologisch Zellen, die bei Antigeneinwirkung auf lymphatisches Gewebe in vivo in Form von teilungsfähigen Zellen der lymphatischen Reihe in Erscheinung treten (9, 17). Lennert beschrieb 1966 diese Zellform als basophile Stammzelle. Gowans et al. (19) wiesen deren Entstehung aus dem kleinen Lymphozyten nach. In neuester Zeit werden dieselben Zellen zu recht als Immunoblasten bezeichnet. Gibt man der Kultur eines tuberkulinüberempfindlichen Individuums anstelle von PHA Tuberkulin, also das spezifische Antigen, zu, so verändern sich die Lymphozyten in derselben charakteristischen Weise wie bei PHA - Zusatz (20). In den Jahren 1966, 1967 und 1968 wurde der Effekt unterschiedlicher Antigene auf Lymphozytenkulturen von sensibilisierten Organismen in vitro bei Mensch und Tier untersucht (21, 22, 23, 24, 25).
Dabei zeigte sich, daß eine Stimulation sowohl bei einer Allergie vom verzögerten Typ (26, 21), als auch vom Soforttyp, wie beispielsweise bei der Pollenallergie, auftritt (27, 28). Ferner ist der Befund rich-

tungweisend, daß Lymphozyten von verschiedenen Spendern in einer Mischkultur sich gegenseitig stimulieren, während Lymphozytenmischkulturen monozygoter Zwillinge keine Stimulierung aufweisen (29). Zusammenfassend läßt sich zur PHA - Wirkung sagen, daß PHA auf unspezifische, jedoch biochemische Weise die Stimulation von Lymphozyten durch spezifische Antigene kopiert. PHA ist ein Eiweiß von Globulincharakter (30), das möglicherweise so strukturiert ist, daß es die Funktion eines " Hauptschlüssels " bei der Lymphozytenstimulation übernimmt. Das Ausmaß einer Antigen- bzw. PHA - Wirkung kann durch Auszählen der blastenartigen Zellen in Ausstrichen von Kulturmaterial festgestellt werden.

4) Die Biochemie der Lymphozytentransformation

Bereits im Jahre 1963 wiesen Elves et al. (31) sowie Bach und Hirschhorn (32) an den in vitro stimulierten Lymphozyten Gammaglobulin nach. Diese Tatsache beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf einer Proteinsekretion. Bach und Hirschhorn (32) haben ein reproduzierbares Verfahren zum Nachweis dieser Proteinsynthese entwickelt, in dem sie zeigen konnten, daß Lymphozyten unter PHA - Einfluß radioaktiv markiertes Phenylalanin in Eiweißketten einbauen.
PHA- bzw. Antigenstimulierung führt in den Kulturlymphozyten während ihrer Transformation zu einer Aktivierung der DNS - und RNS - Synthese. Diese Einblicke konnten durch Isotopenmarkierung mit ^{3}H-Thymidin, ^{3}H- Cytidin und ^{3}H-Uridin gewonnen werden (33, 34).
Mit anderen Worten: Unter dem Einfluß eines spezifischen Antigens antwortet der kleine Lymphozyt in vivo und in vitro mit der Bildung von spezifischen Antikörpern, die als zellständig zu bezeichnen sind. Die Lymphozyten sind also immunkompetente Zellen. Sie leiten

die primäre Immunreaktion ein. Sie sind Träger des pathogenen Faktors und führen die pathologische Reaktion des Gewebes herbei, indem sie eine durch Zytolyse gekennzeichnete Entzündungsreaktion auslösen (35, 36, 37, 38).

III. Methode

Das Prinzip der Methode besteht in der Kultivierung von Blutlymphozyten in Gegenwart von Hautextrakten und nachfolgender Bestimmung der Transformationsrate der Lymphozyten.

Als Kulturgefäße verwendeten wir Erlenmeyerenghalskölbchen mit einem Fassungsvermögen von 50 ml, die sich leicht sterilisieren ließen (1,5 Stunden bei 180 Grad Celsius).

Um eine für das Lymphozytenwachstum günstige CO_2-reiche Atmosphäre zu schaffen, wurden die Erlenmeyerkölbchen mit Silikonstopfen verschlossen, die zuvor 0,5 Stunden bei 120 Grad Celsius im Autoklaven sterilisiert wurden.

Als Kulturmedium wurde das von Morgan et al. (39) 1950 angegebene Gewebekulturmedium 199 10 X (Tissue Culture Medium 199, Difco Lab. Detroit) gebraucht, das mit Ampuwa 1:10 verdünnt wurde. Dem Kulturmedium wurde 0,2 ml Bicarbonate Solution zugegeben, sodaß ein pH-Wert von annähernd 7,5 erreicht wurde.

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden unter sterilen Kautelen aus der V. cubitalis des nüchternen Patienten 5 mal 10 ml Blut entnommen, nachdem die Innenwand der Plastikspritzen zuvor mit je 200 I. E. Heparin (Liquemin^R) als Antikoagulans benetzt worden war.

Die Einmalspritzen wurden dann senkrecht auf ihre Stempel in ein Glasgefäß gestellt, bis die korpuskulären Bestandteile bei Zimmertemperatur nach einer Stunde sedimentiert waren. Danach wurde die oben auf die Spritze aus Gründen der Sterilität aufgesetzte Kanüle abgebogen

und mittels Druck auf den Spritzenstempel das überstehende Plasma und die den Erythrozyten aufgelagerten Leukozyten in die Kulturgefäße in sterilem Raum abgefüllt, bis der erste Tropfen roter Blutkörperchen übertrat.
Dem Kolben A wurde 0,2 ml physiologischer Kochsallösung zugegeben, dem Kolben B 0,2 ml PHA (Wellcome, London). So erhielt man eine negative und positive Kontrollkultur. Weiteren drei Kölbchen wurden gleiche Mengen Hautextrakt als spezifisches Allergen zugegeben. Dieser Hautextrakt wurde in folgender Weise gewonnen: Wir standen vor der schwierigen Frage, wie man Epidermis unter sterilen, reproduzierbaren und für die Probanden möglichst schonenden Bedingungen gewinnen kann.
Für diesen Zweck eignete sich optimal ein Blasenziehgerät, genannt " Dermovac ", das von der Firma Instrumentarium Aleksanterik Helsinki Suomi-Finland hergestellt wird (Abb. 1). Dieses Gerät wurde von verschiedenen Autoren, die sich mit Epidermisstudien befaßten, angegeben (40, 41).

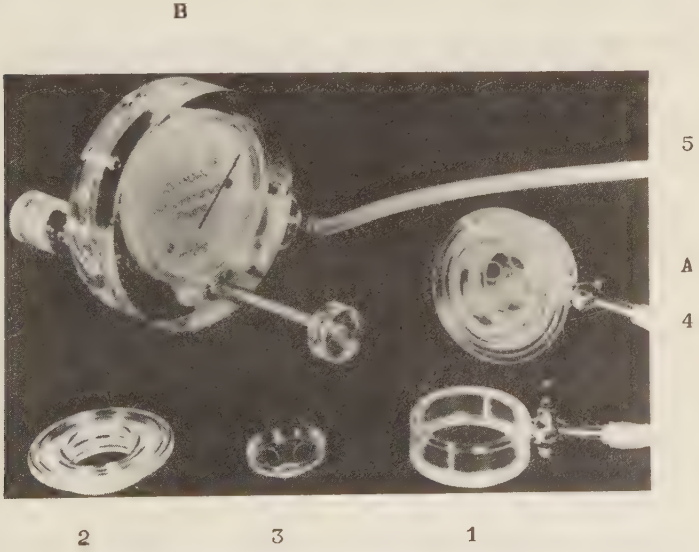

Abb. 1 : Instrumentarium des Blasenziehgerätes " Dermovac ".

konstruktion des " Dermovac "

Das Blasenziehgerät " Dermovac " besteht aus einer Saugkappe (A) und einer davon getrennten Pumpe mit einem Manometer (B).

Die Saugkappe (A) ist aus transparentem Plexiglas gefertigt. Sie schließt eine Saugkammer (1), ein Flanschstück (2) und die Adaptorplatte (3), die sich in die Kappe als perforiertes Diaphragma einsetzen läßt, ein.

Die Saugkammer (1) hat Standardgröße und dient als Pfanne für die auswechselbaren Flanschstücke. Über Hahn und konisches Verbindungsstück (4) wird die Saugkammer mittels eines Schlauchsystems (5) mit der Pumpe verbunden. Die durchsichtige Wand der Saugkammer dient gleichsam als Fenster, durch das die darunterliegende Haut beobachtet werden kann.

Das Flanschstück (2) dient als Kammereinfassung und seine der Haut anliegende Oberfläche ist mit konzentrischen Rillen versehen. Die auswechselbaren Flanschstücke, in ihrer Größe von 15 - 35 mm variierend, können alle an die Standardsaugkammer angeschraubt werden.

Die Adaptorplatten (3) sind ebenfalls auswechselbar und können innerhalb der entsprechenden Flanschstücke befestigt werden. Die Adaptorplatte ist ein konkaves Diaphragma, das ein oder mehrere Löcher (von 1 bis zu mehreren Millimeter Durchmesser), je nach der gewünschten Größe und Zahl der Blasen besitzt. Alle Teile der Saugkappe sind leicht zu sterilisieren mittels 70%igem Äthylalkohal oder Äthylenoxyd.

Die Pumpe selbst besteht aus einer Handpumpe, einem Manometer und einem Ventil, durch das der Druck reguliert werden kann.

Die Skala des Manometers zeigt einen Unterdruck von 0 bis 400 mm Hg an.

Vorgang des Blasenziehens

Zuerst wurde an der Unter- oder Oberarmbeugeseite eine gesunde Hautstelle aufgesucht. Diese Stelle wurde mit 70%igem Alkohol und einem Tupfer mehrmals sanft abgerieben, zuletzt wurde Alkohol darübergegossen. Nachdem die Haut trocken war, wurde die Adaptorplatte mit silikonhaltiger Haftpaste bestrichen und aufgesetzt. Während die Saugkappe leicht aufgedrückt wurde, wurde die Pumpe betätigt, bis das Manometer einen Unterdruck von 300 bis 350 mm Hg anzeigte. Mit Heftpflasterstreifen wurde die Saugkammer an der Haut fixiert, damit die Probanden sich freier bewegen konnten.
Durch die durchsichtige Saugkammer konnte man die Entstehung der Blasen beobachten. Es dauerte zwischen 35 und 135 Minuten bis sich die Blasen prall ausgebildet hatten. Nach Ablassen des Unterdruckes über das Ventil und vorsichtiger Entfernung der Adaptorplatte bot sich ein Bild wie Abb. 2 zeigt.

Abb. 2: Im Zentrum der durch Aufpressen der Adaptorplatte entstandenen konzentrischen Ringe 5 pralle, wasserklare Vesikeln auf gesunder Haut.

Unter sterilen Kautelen wurde mittels einer Tuberkulinspritze die Blasenflüssigkeit aus allen 5 Bläschen abgezogen. Danach wurden die Blasendecken mit steriler Schere und Pinzette vorsichtig abpräpariert und in physiologische Kochsalzlösung bis zur Weiterverarbeitung gelegt. Die iatrogenen Defekte heilten in allen außer 3 Fällen, bei denen es zu einer Superinfektion kam, komplikationslos ab. Es kam dabei zu keiner Narbenbildung.
Blasendecke und Blasenflüssigkeit wurden wie folgt aufgearbeitet.
Unter dem Gesichtspunkt, eine einfach reproduzierbare Methode in der Hand zu haben, und wohl bedenkend, daß jede chemische Substanz, die auf dem Wege über Extraktionsprozeduren zusätzlich dem Kulturmedium zugegeben wird, als Faktor wirksam werden kann, der möglicherweise zu falsch positiven, beziehungsweise falsch negativen Ergebnissen führen kann, wurde die Aufbereitung des gewonnenen Materials möglichst überschaubar vorgenommen.
Die 5 Epidermisläppchen wurden in einem sterilen Kölbchen mit sterilem Mörser vorsichtig homogenisiert und unter Zugabe der Vesikelflüssigkeit mit 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung vermengt.
Je gleiche Teile dieses Gemisches wurden den Testkulturen zugesetzt. Die Erlenmeyerkölbchen wurden verschlossen und 3 später 4, 5 und 6 Tage lang bei 37 Grad Celsius bebrütet. Den Kulturen wurde mit Absicht kein Antibiotikum zugegeben, um bei einer eventuell vorliegenden Sensibilisierung gegen ein Antibiotikum keine falsch positiven Ergebnisse zu bekommen.
Nach den oben angegebenen Zeitabständen wurde das Kulturwachstum unterbrochen. Der Inhalt der Erlenmeyerkölbchen wurde bei 1000 U/ Min. 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert; mittels saugkräftiger Papierstreifen wurde eine weitere Konzentrierung der korpuskulären Bestandteile erreicht. Mit Hilfe einer Öse wurde Kulturmaterial auf entfettete Objektträger gegeben und mit der

kurzen Objektträgerkante ausgestrichen, an der Luft getrocknet und mit Eosin - Methylenblaulösung nach Wright (42) gefärbt.
Durch Auszählen von 200 Lymphozyten pro Präparat wurde die Transformationsrate ermittelt. Die einzelnen Schritte des Untersuchungsganges sind in Tabelle 1 übersichtlich zusammengestellt.

0,8 ml Difco 199 10 X
7,2 ml Ampuwa
0,2 ml Bicarbonate Solution
0,2 ml PHA bzw. NaCl bzw. 0,6 ml Hautextrakt
2 - 3 ml Serum + Leukozyten
3 bzw. 4, 5, 6 Tage bei 37 Grad/C. bebrüten

Zentrifugieren bei 1000 U/ Min., 5 Min.
Dekantieren
Konzentrieren mit Löschpapier
Schütteln mit Schüttelgerät, 10 Sek.
Ausstrich von Sediment
Färben nach Wright

Tabelle 1 : Ausführung der Untersuchung

IV. Ergebnisse und Diskussion

In Voruntersuchungen wurden bei 13 Probanden Lymphozytenkulturen angesetzt (Tabelle 2).
Den Kulturen wurden Blaseninhalt und Blasendecke als Homogenisat getrennt zugegeben bei einer Bebrütungsdauer von 3 Tagen. Anderen Kulturen wurde zusätzlich Hyaluronidase (50 - 150 I.E. Kinetin ^{R}) beigegeben unter der Vorstellung, daß die interzelluläre Kittsubstanz, die vorwiegend aus Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure besteht, aufgelockert und die als Antigen wirksame Substanz zugänglich wird. Zwei Kulturen wurden vor der Bebrütung mit UV-Licht (5 - 15 Minuten) bestrahlt. Eine eventuell eintretende Eiweißfällung sollte zu einem ähnlichen Effekt wie oben führen.
Bei allen diesen Versuchen konnte keine lymphozytäre Aktivität im Sinne einer Transformation (s. später) nachgewiesen werden.
Erst als Kulturen von zwei Probanden mit Pemphigus vulgaris (P.v.) 4 und 5 Tage lang unter Zusatz von Blasendeckenextrakt bebrütet wurden, zeigten sich Veränderungen im Sinne einer Transformation.
Damit war eine gangbare Methode gefunden.

Mit der Eosin - Methylenblaulösung nach Wright erzielten wir einen Färbeeffekt, der trotz kürzerer Färbezeit (3 bis 5 Minuten) dem der panoptischen Färbung nach Pappenheim entsprach.
Die Wright - Färbung ermöglicht eine optimale Differenzierung der Leukozyten in den üblichen Farbtönen:
Die Kerne der Leukozyten und Lymphozyten färben sich rotviolett, das Zytoplasma der Lymphozyten blau, das Monozytenplasma blaugrau, Erythrozyten blaßrosa, eosinophile Granula leuchtendrot bis braunrot, basophile Granula dunkelviolett, neutrophile Granula hellviolett.

Fallzahl	Diagnose	PHA 3Tage	Na Cl =	HE =	Bl.fl. =	HE +UV	Bl.fl +UV	HE +Kin.	Bl.fl. +Kin.	HE 4	HE 5Tage
1	Pemphigus	+	Ø	Ø	Ø						
2	Pemphigus	+	Ø	Ø	Ø						
3	Pemphigus	+	Ø	Ø	Ø						
4	E. e. m.	+	Ø	Ø	Ø						
5	P. o. t.	+	Ø	Ø	Ø						
6	Pemphigus	+	Ø	Ø	Ø						
7	Pemphigus	+	Ø	Ø	Ø						
8	Pemphigus	+				Ø	Ø				
9	Psoriasis v.	+				Ø	Ø				
10	Hypogenital.	+						Ø	Ø		
11	Urticaria	+						Ø	Ø		
12	Pemphigus	+								+	+
13	Pemphigus	+								+	+

Tabelle 2: Voruntersuchungen bei 13 Probanden zur Erarbeitung einer gangbaren Methode.
Erkl. der Abk.: HE = Hautextrakt; Bl.fl. = Blasenflüssigkeit; UV = UV-Licht;
Kin. = Kinetin.

Die Kennzeichen der Lymphozytentransformation sind folgende:
(Abb. 6) Großer, locker strukturierter hellrotvioletter Kern mit einem großen Nukleus und 1 - 3 Nukleolen, ausgeprägte Basophilie des Zytoplasmas, Ausstülpungen der Zellmembran, Vakuolisierung des Zytoplasmas und gelegentlich Auftreten von Mitosefiguren. Diese so veränderten Lymphozyten neigen dazu, sich an stets vorhandene Agglutinate von Erythrozyten, Thrombozyten und Monozyten mit haftfüßchenähnlichen Zellwandfortsätzen anzuheften oder untereinander Kolonien zum Teil in Rosettenform zu bilden.

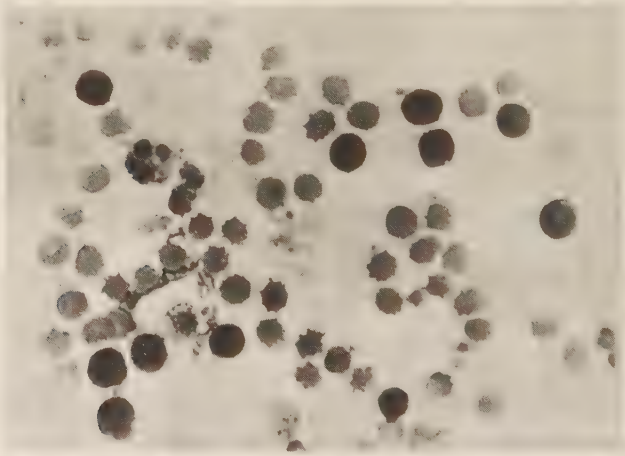

Abb. 3 : Lymphozytenkultur unter Zusatz von NaCl als Kontrolle nach viertägiger Kultivierung.

Fehlerquellen bei der Auszählung ergaben sich einmal aus der schwierigen Zuordnung mancher Lymphozyten. Die färberische Methode stützt sich lediglich auf morphologische Merkmale, während man beispielsweise mit Hilfe der Autoradiographie weit genauer arbeiten könnte. Bei

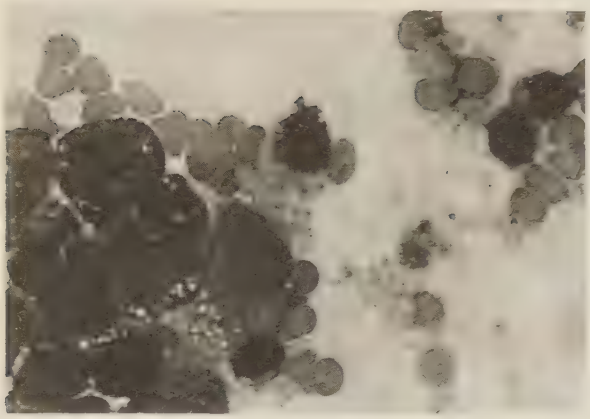

Abb. 4 : Positive Lymphozytenkultur bei einem Patienten mit P. v. unter PHA-Einwirkung; 4 Tage.

der Isotopenmethode wird die mit jeder Stimulierung verbundene DNS- und RNS-Synthese erfaßt. So kommt es vor , daß Zellen ohne lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen bereits eine Nucleinsäuresynthese aufweisen, während in morphologisch vergrößerten Lymphozyten noch keine Bildung von DNS oder RNS nachweisbar ist.
Andererseits weisen die überalterten Kulturen (5. und 6. Tag) reichlich Zelltrümmer und durch starkes Größenwachstum morphologisch veränderte Zellen auf, deren Zuordnung schwerfällt.
Nachfolgend sollen die photographischen Abbildungen einzelner Präparate besprochen werden, wie sie sich bei NaCl-Einwirkung, bei PHA-Einwirkung nach vier Tagen, bei Einwirkung von Hautextrakt auf die Kulturlymphozyten am 4., 5. und 6. Tage der Bebrütung bei lichtmikroskopischer Betrachtung in 1000facher Vergrößerung darboten.

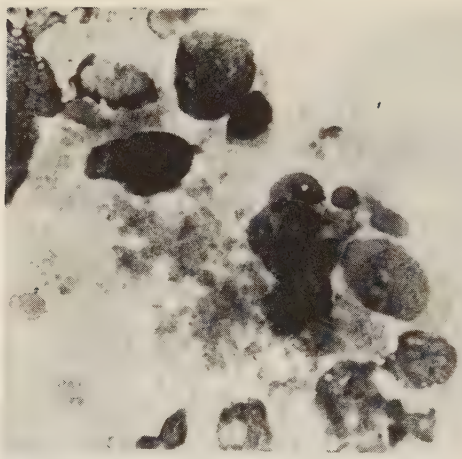

Abb. 5 : Positive Lymphozytenkultur bei einem Pat. mit P. v. unter PHA-Einwirkung; 4 Tage.

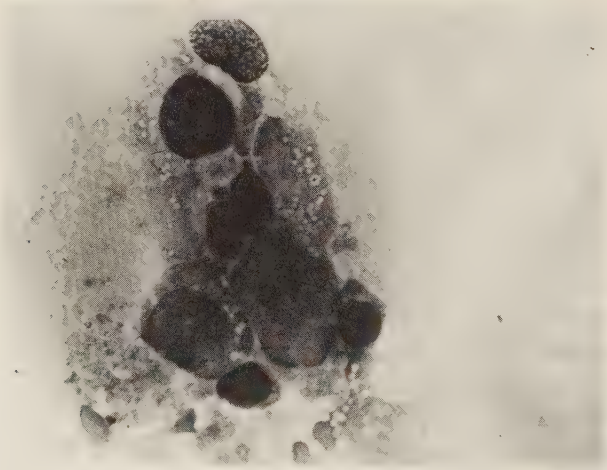

Abb. 6 : Positive Lymphozytenkultur bei einem Pat. mit P. v. unter PHA-Einwirkung; 4 Tage.

Abbildung 3 zeigt einen Ausstrich einer negativen Kontrollkultur ohne Zelltransformation bei einer Bebrütungsdauer von 4 Tagen unter Zusatz von 0,2 ml NaCl (0,9%).

In Abbildung 4 kommt eine Gruppe transformierter Zellen zur Darstellung; diese Zellen drängen sich in typischer Weise zu einem Häufchen zusammen. Rechts oben sind zwei nicht transformierte Lymphozyten zu sehen. Die transformierten Zellen sind gut erhalten, der Zytoplasmasaum ist scharf gezeichnet. Es handelt sich hierbei um die Kultur eines Patienten mit Pemphigus vulgaris unter Zusatz von 0,2 ml PHA bei einer Bebrütungszeit von 4 Tagen.

In Abbildung 5 kommt ein Kulturausstrich desselben Patienten wie in Abbildung 4 zur Darstellung. Man findet sehr gut erhaltene transformierte Zellen, im Bildzentrum sogar eine Mitose (in Meta-bzw. Anaphase) neben Zelldetritus.

In Abbildung 6 sollen die charakteristischen Merkmale der transformierten und der Lymphozyten ohne Transformationsimpuls einander gegenübergestellt werden. Bei drei Zellen sieht man große, locker strukturierte Kerne mit Nukleolen, zahlreiche Zytoplasmavakuolen verschiedener Größe und mehr oder weniger starke bis massive Ausstülpungen der Zellwand sowie die Tendenz zur Gruppenbildung. Vier Lymphozyten sind nicht transformiert. Ihre Kerne sind stark schattengebend wegen dichter Chromosomenpackung. Sie zeigen keine Zytoplasmavakuolen und sind insgesamt dunkler gefärbt als die benachbarten transformierten Zellen.

In Abbildung 7 sind im Zentrum drei transformierte Zellen zu sehen umgeben von Lymphozyten in beginnender und solchen ohne Aktivität. Es handelt sich hier um einen Patienten mit Pemphigus vulgaris bei einer Bebrütungsdauer der Kulturen von 4 Tagen unter Zugabe von 0,6 ml Hautextrakt. Es sind außerdem mehrere segmentkernige Leukozyten zu sehen.

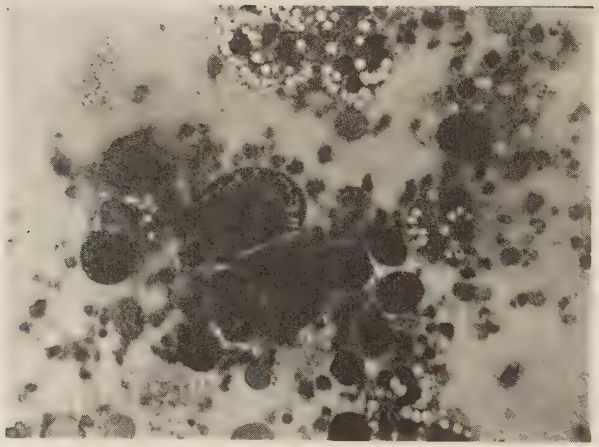

Abb. 7 : Positive Lymphozytenkultur bei P. v. unter Zusatz von 0,6 ml Hautextrakt; 4 Tage.

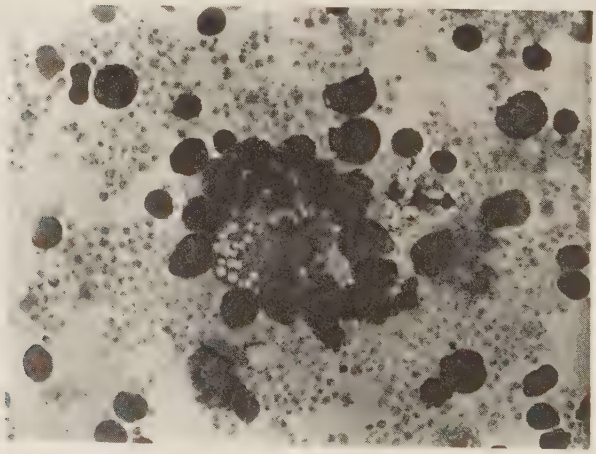

Abb. 8 : Positive Lymphozytenkultur bei P. v. unter Zusatz von 0,6 ml Hautextrakt; 5 Tage.

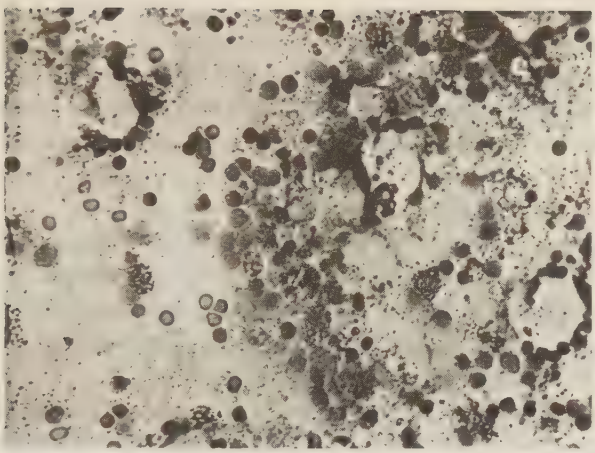

Abb. 9 : Positive Lymphozytenkultur bei P. v. unter Zusatz von 0,6 ml Hautextrakt; 6 Tage (Vergr. 400fach).

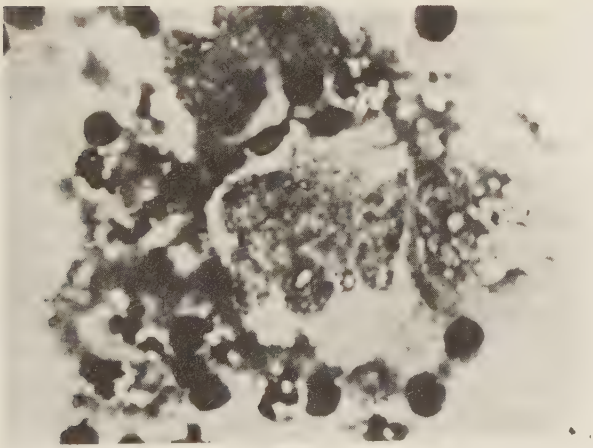

Abb. 10 : 1000fache Vergrößerung aus Abbildung 9

Abbildung 8 zeigt einen Kulturausstrich desselben Patienten wie in Abbildung 7 unter Zugabe von 0,6 ml Hautextrakt bei einer Bebrütungsdauer von 5 Tagen. Um einen zentral gelegenen transformierten Lymphozyten ordnen sich in Rosettenform Lymphozyten im Stadium der beginnenden Transformation und nicht transformierte Zellen an. Randwärts finden sich reichlich Zelltrümmer.

Die Abbildung 9 bringt eine 6-Tage-Kultur bei Pemphigus vulgaris mit demselben Zusatz wie in Abbildung 8 zur Darstellung. Im Präparat findet man drei Rosetten aus Lymphozyten. Hier wurde der besseren Übersicht wegen die 400fache Vergrößerung gewählt.

Im Zentrum der Rosetten - Abbildung 10 - ist im Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung eine netzartige Struktur zu erkennen mit einem exzentrisch gelegenen Nukleus und zwei Nukleolen. In beiden Präparaten (Abb.9 und Abb. 10) finden sich reichlich amorphe Massen, die wohl durch Zellautolyse entstanden sind.

Kasuistik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 79 Patienten untersucht. Für diese Veröffentlichung wurden 44 Patienten ausgewählt und in fünf Gruppen aufgeteilt:

1) Gesunde Kontrollpersonen (n=12);
2) Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring (n=9);
3) Patientengruppe mit Porphyria cutanea tarda (n=8);
4) Patientengruppe mit Pemphigus (n=12);
5) Patientengruppe mit Alterspemphigus (n=3).

Die Diagnosen wurden auf Grund der Anamnese und der klinischen Befunde gestellt. Die Gruppen 1-5 sollen an Hand von Tabellen vorgestellt werden. Die Befunde werden diskutiert und vergleichend betrachtet.

1) Gesunde Kontrollpersonen

Unter die Gruppe der gesunden Kontrollpersonen wurden Patienten subsumiert, die nicht an blasenbildenden Dermatosen erkrankt waren. Aus Tabelle 3 läßt sich die Zusammensetzung ersehen.
Im einzelnen handelt es sich hierbei um zwei Patienten mit Psoriasis vulgaris, die typische Hauterscheinungen aufwiesen. Zwei Patienten hatten ulcera cruris. Zwei Untersuchte litten an Akne necroticans und conglobata. Bei einem Patienten wurde die Diagnose eines Erythema exsudativum multiforme gestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung fanden sich nur noch Resteffloreszenzen.
Ein Patient litt an einer Epididymitis unklarer Genese; ein anderer an einer Phlebothrombose der ganzen linken unteren Extremität mit Ödemneigung. Ein Proband hatte eine oberflächliche Vaskulitis, einer Nagelveränderungen im Sinne einer Onycholysis semilunaris. Bei einem Pa-

Zahl	Name	Alter	Geschl.	Erkrankung	Hauterscheinungen	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6Tage
1	R.L.	34	m.	Psor.vulg.	Erytneme/Schuppung	0	65	7	1	1
2	K.G.	39	m.	E. e. m.	Papulovesikeln	0	48	1	1	Ø
3	G.A.	33	w.	Akne necr.	Papulopusteln	0	92	5	14	10
4	H.H.	20	m.	Akne congl.	Komedonen/Pusteln	4	83	6	4	7
5	G.W.	19	m.	Ulcus cruris	Ulcus	0	90	8	7	3
6	M.L.	73	m.	Ulcus cruris	Ulcus	1	79	10	12	1
7	St.A.	24	m.	Epidydimitis	Ø	0	60	5	4	1
8	E.N.	19	m.	Phlebothrombose	Ödem	0	79	3	1	1
9	S.I.	50	m.	Psor.vulg.	Erytheme/Schuppung	1	62	7	5	1
10	S.D.	57	m.	Vaskulitis	Ø	2	71	5	1	4
11	H.O.	49	m.	Lymph.infiltr.	Ø	1	92	11	6	9
12	S.H.	21	m.	Onycholysis	Ø	0	85	14	10	12
$\bar{x}n = 12$		36,5					75,3	6,8	5,5	4,5

Tabelle 3: Patientengruppe ohne blasenbildende Dermatosen.
PHA = Phytohämagglutinin; HE = Hautextrakt

Zahl	Name	Alter	Geschl.	Erkrankung	Hauterscheinungen	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
1	W.H.	50	m.	D.H.Duhring	Vesikeln	2	89	13	12	7
2	P.M.	51	m.	D.h.Duhring	Vesikeln	3	83	9	10	5
3	O.J.	49	w.	D.h.Duhring	keine	1	69	10	8	6
4	F.M.	49	w.	D.h.Duhring	keine	0	39	10	11	10
5	H.I.	22	w.	D.h.Duhring	keine	3	87	5	2	6
6	D.P.	71	m.	D.h.Duhring	Vesikelreste	2	90	1	8	6
7	D.S.	55	m.	D.h.Duhring	keine	0	85	2	5	5
8	G.L.	58	w.	D.h.Duhring	Papeln/Pruritus	0	81	4	5	2
9	K.R.	33	m.	D.h.Duhring	keine	0	70	3	11	6
$\bar{X}$ = 9		48,6					77	6,3	6,9	5,9

Tabelle 4: Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring.

Zahl	Name	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Hauterscheinungen	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
1	S.K.	58	m.	P. c. t.	keine	4	89	10	5	1
2	W.A.	47	m.	P. c. t.	keine	2	61	5	11	6
3	E.H.	43	m.	P. c. t.	keine	1	71	4	13	3
4	W.E.	50	m.	P. c. t.	Vesikelreste	0	80	10	3	7
5	B.A.	63	m.	P. c. t.	keine	4	78	6	Ø	Ø
6	R.S.	63	m.	P. c. t.	Vesikelreste	6	41	11	Ø	17 (!)
7	R.E.	48	m.	P. c. t.	keine	4	Ø	6	5	1
8	S.E.	65	m.	P. c. t.	keine	3	87	5	2	6
$\bar{X}n = 8$		54,2					72,4	7,3	6,0	5,1

Tabelle 5 : Patientengruppe mit Porphyria cutanea tarda.

Zahl	Name	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Hauterscheinungen	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
1	W.K.	66	m.	Pemphig.vulg.	keine	1	79	27	22	13
2	W.R.	53	w.	Pemphig.vulg.	schlaffe Vesikeln	5	70	19	10	16
3	G.M.	58	w.	Pemphig.vulg.	Vesikeln/Krusten	1	75	25	13	8
4	G.M.	72	w.	Pemphig.vulg.	Vesikeln/Krusten	1	86	19	11	5
5	H.F.	67	w.	Pemphig.vulg.	Vesikeln/Krusten	3	61	19	13	10
6	G.F.	59	w.	P.Senear-Usher	Narbenzüge	0	95	31	30	Ø
7	B.L.	57	w.	Pemphig.vulg.	Vesikeln	0	69	17	9	15
8	A.R.	46	w.	Pemphig.vulg.	Vesikeln	5	84	11	7	5
9	M.M.	42	m.	Pemphig.vulg.	keine	0	61	11	13	9
10	T.L.	49	w.	Pemphig.vulg.	keine	0	90	10	17	Ø
11	H.E.	36	m.	Pemphig.vulg.	keine	0	92	30	21	11
12	S.E.	28	m.	P.Senear-Usher	keine	0	79	12	19	4
$\bar{X}n = 12$		52,7					78,4	19,2	15,4	8,0

Tabelle 6: Patientengruppe mit Pemphigus.

Zahl	Name	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Hauterscheinungen	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
1	K.G.	78	m.	Alterspemphigus	keine	2	73	16	13	13
2	S.M.	77	w.	Alterspemphigus	keine	0	96	ø	22	ø
3	K.R.	77	m.	Alterspemphigus	Vesikeln	0	90	22	18	15
$\bar{X}n = 3$		77,1					86,0	18,0	17,6	14,0

Tabelle 7 : Patientengruppe mit Alterspemphigus.

tienten wurde die Diagnose einer lymphocytic infiltration gestellt; er hatte zum Untersuchungszeitpunkt keine Hauterscheinungen.
Das Geschlecht der Probanden war gemischt. Das Alter lag zwischen 19 und 73, im Mittel bei 36,5 Jahren.
Bei Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung zeigten die Kontrollkulturen eine spontane Transformationsrate von maximal 4%; dabei betrug die Bebrütungsdauer 4 Tage. Die Transformationsrate unter PHA-Einfluß betrug nach viertägiger Kultivierung zwischen 48 und 92%, im Mittel 75,3%. Bei Zusatz von Hautextrakt zum Kulturmedium fanden wir nach 4 Tagen 1-14, im Mittel 6,8 große blastenartige Zellen, nach 5 Tagen ebenfalls 1-14, im Mittel 5,5 und nach 6 Tagen 1-12, als Mittelwert 4,5 solcher Zellen.

2) Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring

Das Krankheitsbild der Dermatitis herpetiformis, von dem Amerikaner Louis Duhring (1845-1913) im Jahre 1884 erstmals beschrieben, ist charakterisiert durch die Vielgestaltigkeit seiner klinischen Erscheinungen.
Histopathologisch kommt es dabei zu einer subepidermalen, nicht akantholytischen Blasenbildung und damit zur vollständigen Ablösung des Epithels vom Corium. Die Epidermolysis entsteht durch Entzündungsprozesse. Im Blasengrundausstrich sind keine akantholytischen Zellen zu finden, meist jedoch Lymphozyten (43,44).
Nach Riecke (44) lassen Beobachtungen wie Aufsplitterung der Faserstruktur der Basalmembran und Entzündungsprozesse im Corium an eine Sensibilisierung des Organismus denken, zumal eine Jodunverträglichkeit nachweisbar ist.
Nach Korting (45) wird außer der Lokaltherapie innerlich mit DADPS (50-100mg/die p.o.) behandelt.

ACTH und Cortisonderivate sind gegenüber dem DADPS weit unterlegen.
Bei der von uns untersuchten Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring (Tabelle 4) handelte es sich um fünf Patienten und vier Patientinnen. Der Altersquerschnitt betrug 48,6 Jahre.
Fünf Kranke hatten zur Zeit der Untersuchung keine Hauterscheinungen, vier hatten Hauterscheinungen in Form von Pruritus, Prurigoknötchen, Vesikeln und Vesikelresten. Drei wurden zum Untersuchungszeitpunkt nur mit Externa behandelt, ein Patient (Nummer 6) mit 0,1g DADPS/die.
Die Lymphozytenkulturen bei dieser Gruppe zeigten spontane Transformationen zwischen 0-3%. Bei PHA-Zusatz ergab sich eine Transformationsrate zwischen 39 und 90%, im Durchschnitt von 77%.
Nach vier Tagen Bebrütung mit Epidermisextrakt fanden wir in allen Kulturen Transformationen, die jedoch stark streuten, nämlich von 1 bis 13; der Mittelwert betrug 6,3%. Nach 5 Tagen konnten ähnliche Befunde erhoben werden. Die Transformationsrate lag zwischen 2 und 12%, im Mittel bei 6,9%. Nach 6 Tagen lag die Zahl der Transformationen zwischen 2 und 10, im Schnitt bei 5,9%.

3) Patientengruppe mit Porphyria cutanea tarda

Das Krankheitsbild der Porphyria cutanea tarda (Waldenström) ist klinisch charakterisiert durch varioliforme Blasenbildung an lichtexponierten Körperstellen wie Gesicht, Nacken und Handrücken (43,44). Es werden vorwiegend Männer im mittleren Lebensalter zwischen 40 bis 60 Jahren befallen.
Pathogenetisch liegt dieser Erkrankung ein Leberscha-

den bei Hypersiderämie zugrunde (44). Therapeutisch steht die Leberbehandlung im Vordergrund, zusätzlich wird eine Eisenausschleusung mittels Desferrioxaminhydrochlorid (Desferal R 800 - 1200 mg/ die i.m.)betrieben, sowie eine Aderlaßbehandlung (45).

Bei den von uns untersuchten Patienten mit Porphyria cutanea tarda handelte es sich um Männer in einem Altersquerschnitt von 54,2 Jahren. 6 Patienten hatten zum Untersuchungszeitpunkt keine Hauterscheinungen, sie hielten eine Leberdiät ein und bekamen Medikamente mit " Leberschutzfunktion ". Zwei Patienten hatten Hauterscheinungen in Form von Blasenresten an Nacken und Handrücken.

Die Lymphozytenkulturen erbrachten folgende Befunde:

Bei NaCl - Zusatz fanden wir 0 - 6 spontane Transformationen. Die Kulturen mit PHA - Zusatz waren mit einer Ausnahme alle positiv. Wir fanden zwischen 41 und 89 %, im Querschnitt 72,4 % transformierte Zellen unter den ausgezählten Lymphozyten.

Die Zahlen bei Hautextrakt - Zusatz waren nach viertägiger Bebrütung um 7,3 als Mittelwert wenig gestreut, nämlich zwischen 5 und 11. Nach 5 Tagen konnten wir Werte zwischen 2 und 13, im Schnitt 6 % finden, wobei 2 Kulturen wegen bakterieller Verunreinigung verworfen werden mußten. Nach 6 Tagen lag der prozentuale Anteil an transformierten Lymphozyten bei 5,1 im Mittel; die Einzelwerte streuten von 1 - 17. Eine Kultur konnte nicht verwertet werden.Die Ergebnisse der Kulturen des Patienten unter Nummer 6 sind insofern auffällig, als sowohl eine hohe Rate an Spontantransformationen wie nach fünf - und sechstägiger Kultivierung bei Epidermisextraktzusatz bestehen, während die Anzahl der Transformationen bei PHA - Zugabe relativ klein ist.

Auch hier ist eine abfallende Tendenz der Transformationsraten vom 4. bis 6. Tag hin zu beobachten.

4) Patientengruppe mit Pemphigus

Früher wurden alle blasenbildenden Dermatosen mit der Bezeichnung Pemphigus belegt. Heute gehören zur Pemphigusgruppe im engeren Sinne der Pemphigus vulgaris, der Pemphigus vegetans als vegetierende Variante des Pemphigus vulgaris, der Pemphigus foliaceus, der Pemphigus seborrhoicus (Senear-Usher-Syndrom), der familiäre benigne Pemphigus (Gougerot; Hailey-Hailey), der benigne Schleimhautpemphigus sowie der sogenannte Alterspemphigus (Steigleder) bzw. Parapemphigus (Prakken und Woerdemann), im angloamerikanischen Schrifttum nach Lever als bullöses Pemphigoid bezeichnet (43,44,45,46).
Histopathologisch kommt es beim Pemphigus zu akantholytischer Blasenbildung, also zu einer Blase durch Lösung der Interzellularbrücken des Stratum spinosum. Die akantholytischen Zellen (Tzanck) degenerieren und werden im Blasengrundausstrich gefunden.
Im elektronenmikroskopischen Bild zeigt sich dabei eine Degeneration der Interzellularsubstanz bzw. der Interzellularbrücken, die Einrisse aufweisen (45).
Beim Alterspemphigus ergibt sich ein anderes Bild. Schon klinisch zeigen sich auffallende Unterschiede. Die Blasen sind hierbei nicht schlaff, sondern prall. Sie zeigen beim Alterspemphigus eine bessere Heilungstendenz; die Mundschleimhaut ist seltener befallen. Die Patienten befinden sich durchweg im Greisenalter (46).
Das histologische Bild zeigt lichtmikroskopisch subepidermale Blasenbildung (46), elektronenmikroskopisch Verdickung und Unterbrechung der Basalmembran.
Der Alterspemphigus wurde auf Grund dieser klinischen und histologischen Aspekte lange Zeit nicht zum Pemphigus gerechnet, sondern mit der Dermatitis herpetiformis Duhring, bei der es ebenfalls im lichtmikroskopischen Bild zu subepidermaler Blasenbildung kommt ,

in Zusammenhang gebracht (43, 47).
Im Serum von Patienten mit Pemphigus und Alterspemphigus konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode (48) Antikörper gegen Bestandteile von Plattenepithel festgestellt werden (49, 50, 51, 52, 53, 54).
Beim Pemphigus haften die Antikörper an Strukturen der epidermalen Interzellularsubstanz. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich die Bildung der intraepidermalen Blasen erklären. Beim Alterspemphigus sind die Antikörper an der Basalmembran nachweisbar, wodurch die Entstehung von subepidermalen Blasen erklärbar wird (46, 55, 56).
Grob und Inderbitzin (57) konnten diesen Vorgang tierexperimentell belegen. Ferner wurde nachgewiesen, daß bei Pemphiguspatienten vermehrt Komplement verbraucht wird (58).

Auch die augenblicklich guten Erfolge mit der Immunsuppressivtherapie bei Pemphigus in allen Erscheinungsformen, worauf Rassner(59) auf dem Dermatologenkongreß 1968 in Tübingen hinwies, sprechen für ein immunologisches Geschehen bei diesen Erkrankungen.
Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß eine Reihe von Autoren aus ungarischen und italienischen Dermatologenkreisen über die Ätiologie des Pemphigus anderer Ansicht sind. Sie halten ein Virus für die auslösende Ursache des Pemphigus (60, 61, 62, 63, 64, 65).

Wir führten die Ergebnisse bei Lymphozytenkulturen von Patienten mit Pemphigus und Alterspemphigus in zwei gesonderten Tabellen auf, nicht um die Zugehörigkeit zu verschiedenen Erkrankungsgruppen zu betonen, sondern um die Einzeldaten besser überblicken zu können und etwa vorhandene Gemeinsamkeiten augenfälliger zu machen.
In der Patientengruppe mit Pemphigus sind 8 weibliche und 4 männliche Probanden zusammengefaßt (Tabelle 6). Der Altersdurchschnitt der Untersuchten lag bei 52,7 Jahren;

der jüngste Patient war 28, der älteste 72 Jahre alt.
Bei 10 Patienten wurde die Diagnose Pemphigus vulgaris, bei 2 Patienten die Diagnose Senear - Usher - Syndrom gestellt. 5 Patienten hatten zum Untersuchungszeitpunkt keine Hauterscheinungen; die anderen hatten typische Hautveränderungen.
Ein Großteil der Patienten stand zum Untersuchungszeitpunkt bereits unter Corticoidtherapie. Lediglich die Patienten mit den Nummern 2, 3, 4, 5 wurden vor Therapiebeginn, also am Tage der stationären Aufnahme, untersucht. Wir konnten, abgesehen von einem Fall, keine wesentliche Hemmwirkung des Cortisonderivates auf die Lymphozytentransformation feststellen.
In diesem einen Fall wurde derselbe Patient einmal untersucht unter einer Dosis von 110 mg Solu - Decortin ^{R}/die und ein zweites Mal nach Remission unter einer Erhaltungsdosis von 10 mg Decortin/die.
In Tabelle 8 kommt eine erhebliche Differenz der Lymphozytentransformationsraten unter hoher und niedriger Corticoiddosis zur Darstellung. Unter PHA - Einwirkung auf die Kulturen bleibt diese Differenz jedoch aus.
Diese Befunde sollen ohne weitere Diskussion angeführt werden, weil wir auf Seite 3 der Arbeit eine mögliche Beeinflussung der Transformationen durch Corticoide erwogen haben. Eine definitive Antwort bleibt anderen Untersuchungen vorbehalten.

Medikament/Dosis	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
110 mg Solu-Decortin	0	81	9	5	1
10 mg Decortin	1	79	27	22	13

Tabelle 8: Differenz der Lymphozytentransformationsrate unter hoher und niedriger Corticoiddosis.

Alle anderen Probanden der Pemphigusgruppe standen zum Untersuchungszeitpunkt unter einer weit geringeren Corticoiddosis (Erhaltungsdosis) oder erhielten kein Cortison.
Aus Tabelle 6 läßt sich eine spontane Transformationsrate von 0 - 5, eine mittlere Transformationsrate unter PHA - Einfluß von 78,4 % (Streuung der Einzelwerte von 61 bis max. 95 %) ersehen, bei viertägiger Kultivierung mit Epidermisextrakt eine mittlere Transformationsrate von 19,2 % (Streuung der Einzelwerte von 11 bis max. 31), bei fünftägiger Kultivierungsdauer eine Transformationsrate von 15,4 % im Mittel (Streuung der Einzelwerte von 7 bis max. 30) und nach sechstägiger Bebrütung eine mittlere Rate von 8 % (Streuung von 4 bis max. 16 %).
Nach 6 Tagen konnten nur noch 10 Kulturen ausgewertet werden.
Bei der Patientengruppe mit Alterspemphigus (Tabelle 7) finden wir folgende Eizelheiten. Der Altersdurchschnitt liegt mit 77,1 Jahren sehr hoch. Dies mag auch der Grund sein, daß wir während des Zeitraumes, da wir den experimentellen Teil dieser Arbeit ausführten, - ungefähr 6 Monate - nur 3 Patienten mit Alterspemphigus untersuchen konnten. Die Patienten erleben entweder ihren Alterspemphigus nicht mehr oder sie sterben in den ersten Monaten bzw. Jahren ihrer Erkrankung. Zwei Probanden hatten keine Hauterscheinungen, ein Patient hatte zum Untersuchungszeitpunkt typische Hautveränderungen.
Spontan transformierten in den Kulturen 2 % der Lymphozyten. Der Mittelwert der PHA - induzierten Transformationen war 86 % (Streuung 73 - 96 %), der durch Zugabe von Hautextrakt verursachte Transformationsmittelwert betrug nach einer Kultivierungsdauer von 4 Tagen 18 % (Streuung 16 - 22 %), nach einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen 17,6 % (Streuung 13 - 22 %), nach einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen 14 % (Streuung 13 - 15 %). Bei der Auszählung der Kulturen am 4. und 6. Tag konnten nur jeweils zwei Kulturen verwertet werden.

Vergleichende Diskussion

In Tabelle 9 werden die prozentualen Mittelwerte der Lymphozytentransformationen aller 5 Untersuchungsgruppen zusammengestellt.
Vergleicht man die entsprechenden Parameter bei allen 5 untersuchten Gruppen, lassen sich folgende Befunde erheben.
Der Altersdurchschnitt liegt bei den Gruppen 2, 3 und 4 mit 48,6 - 54,2 Jahren in annähernd gleicher Höhe.Bei der gesunden Kontrollgruppe liegt er niedriger (36,5), bei Gruppe 5 höher (77,1).
Die spontane Transformationsrate bewegt sich zwischen 0 - 6 bei allen 5 Gruppen. Bei 3 Gruppen sind die Zahlen kleiner, nämlich 0 - 4 %.
Scheurlen (66) findet bei Lymphozytenkulturen spontane Transformationen bis maximal 4 %, Palacios (67) zwischen 0 - 3 %, Hashem (68) nur bis maximal 1 %. Johnson (69) findet weit höhere Transformationsraten, nämlich zwischen 5,0 und 48,0 %. Doch ist die erhebliche prozentuale Streubreite auf Bebrütung der Lymphozyten bei unterschiedlichen Kulturmedien zurückzuführen.

Nr.	Diagnose	Zahl (n)	Alter	NaCl % 4	PHA % 4	HE % 4	HE % 5	HE % 6 Tage
1	Kontrolle	12	36,5	0-4	75,3	6,8	5,5	4,5
2	D. h. D.	9	48,6	0-3	77,0	6,3	6,9	5,9
3	P. c. t.	8	54,2	0-6	72,4	7,3	6,0	5,1
4	Pemphigus	12	52,7	0-5	78,4	19,2	15,4	8,0
5	Alters-P.	3	77,1	0-2	86,0	18,0	17,6	14,0

Tabelle 9: Zusammenstellung der prozentualen Mittelwerte der Lymphozytentransformationen bei allen 5 untersuchten Gruppen.

Die durch das nichtspezifische Stimulans PHA hervorgerufenen Transformationen ergeben bei den Gruppen 1-4 annähernd gleiche Werte von 72,4-78,4%. Bei Gruppe 5 finden wir einen höheren Mittelwert von 86,0%.
Die von uns gefundenen Werte entsprechen den im Schrifttum angegebenen Werten (Tabelle 10).

Autor	Jahr	Diagnose	Zahl (n)	PHA (%)	Mittelwert (%)
Astaldi	1965	normal	10	45-85	
Yoffey	1965	normal	8		65
Hersh	1965	normal	35	58-85	
Pössnevora	1966	normal	6	69-92	
Heine	1966	normal	17	76-92	84

Tabelle 10: Schwankungsbreite der Lymphozytentransformationen in % unter PHA-Einfluß bei verschiedenen Autoren (variiert nach Heine et al.).

Bei der 4 Tage dauernden Kultivierung von Lymphozyten unter Zusatz von Epidermisextrakt finden wir bei den Gruppen 1-3 im Mittel annähernd gleiche Werte zwischen 6,3-7,3%; bei den Gruppen 4 und 5 ebenfalls zwischen 18,0 und 19,2%. Die Mittelwerte von Gruppe 4 und 5 sind jedoch fast dreimal so hoch wie die Vergleichswerte. Nach 5 Tagen finden sich ähnliche Verhältnisse. Die Gruppen 1-3 zeigen mit Mittelwerten zwischen 5,5 und 6,9% annähernd gleiches Verhalten und die Gruppen 4 und 5 ihrerseits mit Werten von 15,4 und 17,6%. Nach sechstägiger Kultivierung sind die Transformationsraten bei den Gruppen 1-3 wiederum etwa gleich hoch, nämlich 4,5-5,9% im Mittel; sie liegen bei

Gruppe 4 mit 8,0 % höher und bei Gruppe 5 mit 14,0 % weit über der Norm. Bei Betrachtung dieser Befunde stehen zwei Fragen zur Debatte. Weshalb kommt es überhaupt unter Zusatz von Epidermisextrakten zum Kulturmedium zu Transformationen? Warum sind die Transformationsraten bei den Gruppen 4 und 5 auffallend höher als die bei den Vergleichsgruppen 1 - 3?

Wie schon besprochen können verschiedene Substanzen Lymphozytentransformationen hervorrufen (Seite 4 - 5):

a) Phytohämagglutinin auf unspezifische, noch nicht bis in alle Details geklärte Weise.

b) Spezifische Antigene, gegen die der Proband sensibilisiert wurde, z. B. Penicillin bei Penicillinallergie.

c) Zell - bzw. Epidermisextrakte (70), wie sie in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Abgesehen davon, daß es in geringer Zahl zu spontanen Transformationen kommen kann, können bestimmte Bestandteile der Hautextrakte, wie die Anwesenheit von Bakterien, normalerweise bereits in gesunder Haut oder in der Haut bei Entzündungsprozessen vorkommende Substanzen (67) oder andere,noch nicht genau definierbare Ursachen,zur Transformation von Lymphozyten in unseren Kulturen geführt haben.
Die augenfällige Erhöhung der Transformationsraten bei den Gruppen 4 und 5 möchten wir jedoch dahingehend interpretieren, daß in den vorliegenden Fällen die erkrankte Haut oder eine Fraktion der erkrankten Haut Antigencharakter besaß.
Gibt man der Lymphozytenkultur eines allergisierten Individuums das spezifische Antigen zu, so verändern sich die kleinen Lymphozyten in derselben charakteristischen Weise wie bei PHA - Zusatz (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Bei den Gruppen 4 und 5 handelt es sich um Patienten mit Pemphigus und Alterspemphigus.
Folgerichtig müssen wir also aus den Beobachtungen schließen, daß den Krankheitsbildern des Pemphigus und Alterspemphigus als ätiologischer Faktor ein allergisches Geschehen zugrundeliegt oder zumindest an der Entstehung und Fortdauer beteiligt ist.
Da wir bei beiden Gruppen annähernd dieselben Befunde erheben konnten, möchten wir dies als weiteren Hinweis ansehen, daß der Alterspemphigus nicht nur nosologisch, sondern auch ätiologisch der Gruppe der Pemphiguserkrankungen zuzuordnen sei.
Weder bei der Porphyria cutanea tarda noch beim Krankheitsbild der Dermatitis herpetiformis Duhring fanden wir anhand unserer Untersuchungsergebnisse einen Hinweis auf das Vorliegen eines allergischen Geschehens. Die Lymphozytenkulturen dieser beiden Erkrankungsgruppen verhalten sich wie die der gesunden Kontrollpersonen.
Die chemische Analyse des Pemphigusantigens steht bis heute noch aus. Christophers (71) wies auf dem Dermatologenkongreß 1968 in Tübingen darauf hin, daß es sich beim Pemphigusantigen um eine Lipoproteinkomponente handelt.
Es sei abschließend daraufhingewiesen, daß andere Autoren auf Grund ähnlicher Versuchsanordnungen und Ergebnisse bei " infantile eczema "(68) und " atopic dermatitis " (67) ebenfalls ein immunologisches Geschehen als auslösende Ursache dieser Erkrankungen in Erwägung ziehen.
Somit scheint Whitfield (72) in seiner Forderung nach immunologischer Ätiologie von Hautkrankheiten recht zu bekommen.
Die Technik der Lymphozytenkultur, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, erscheint als brauchbare und empfindliche Methode, um den Mechanismus der Sensibilisierung von Individuen nicht nur gegen körperfremde, sondern auch gegen körpereigene Stoffe, wie hier gegen Epidermisextrakte, aufzudecken.

Möglicherweise kann dem Kliniker eines Tages nach Analyse des Pemphigusantigens ein einfacher, ergänzender Test zum Nachweis der Überempfindlichkeit gegen eigene Haut in die Hand gegeben werden.

V. Zusammenfassung

Menschliche Blutlymphozyten können durch Stoffe mit antigenartigem Charakter oder durch Antigene, gegen die Individuen sensibilisiert wurden, in vitro zu großen lymphoblastenartigen Zellen transformiert werden.
Es wird eine Methode zur vier- bis sechstägigen Kultivierung von Lymphozyten beschrieben.
Mit Hilfe dieser Technik werden positive Ergebnisse bei 5 untersuchten Gruppen erzielt:
Bei gesunden Kontrollpersonen (n = 12), bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring (n = 9), bei Patienten mit mit Porphyria cutanea tarda (n = 8), bei Patienten mit Pemphigus (n = 12) und bei Patienten mit Alterspemphigus (n = 3).
Die Lymphozytentransformationsraten betrugen bei gesunden Kontrollpersonen im Mittel maximal 6,8 %, bei der Patientengruppe mit Dermatitis herpetiformis Duhring maximal 6,9 %, bei der Patientengruppe mit Porphyria cutanea tarda maximal 7,3 %, bei der Gruppe mit Pemphigus maximal 19,2 % und bei der Patientengruppe mit Alterspemphigus maximal 18,0 %.
Die Lymphozytentransformationen bei den gesunden Kontrollpersonen, den Patientengruppen mit Dermatitis herpetiformis Duhring und Porphyria cutanea tarda werden als durch Bakterien und andere unspezifische Agentien verursacht angesehen.
Die hohen Transformationsraten bei den Pemphigus - " Gruppen " weisen auf das Vorliegen eines allergischen, wahrscheinlich autoallergischen Geschehens hin. Den Beweis wird die Analyse des Pemphigusantigens erbringen.

VI. Literaturverzeichnis

1 Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res, 20, 462 - 466 (1960).

2 Humble, I.G.: In vivo action of phytohemagglutinin in severe human aplastic anaemia. Nature 198, 1313 - 1314 (1963).

3 Bach, F. und K. Hirschhorn: Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility-test in vitro. Science 143, 813 - 814 (1964).

4 Astaldi, G.: Das Phytohämagglutinin und das Problem des Lymphozyten. Med. Klin. 59, 368 - 371 (1964).

5 Barkan, B. and A. Ballas : Phytohemagglutinin: Separation of hemagglutinating and mitogenic principles. Nature (Lond.) 200, 141 - 142 (1963).

6 Gropp, A. und R. Fischer : Ergebnisse der Züchtung von Lymphozyten in vitro. Klin. Wschr. 44, 665 - 671 (1966).

7 Robbins, H.J.: Tissue culture studies of the human lymphocyte. Experiments under controlled conditions provide new information on this cell's function and potentiality. Science 146, 1648 - 1654 (1964).

8 Sauli, S. und G. Astaldi : Die Proliferationsaktivität der Leukozyten des normalen menschlichen Blutes in Gegenwart des PHA. Schweiz.med.Wschr. 93, 1475-1477 (1963).

9 Heine, K.M. und H. Stobbe : Die Anwendbarkeit der Lymphozytenkultur als klinischen Funktionstest. Dtsch. Ges.wesen 22, 1977-1980 (1967).

10 Nowell, P.C.: Inhibition of human leucocyte mitosis by prednisolone in vitro. Cancer Res. 21, 1518 - 1521 (1961).

11 Stefani, S. and Y.T. Oester : Effect of prednisolone on the phytohemagglutinin induced radioresistance and blastoid transformation of human lymphocytes in vitro. Transplant. Bull. 5, 317-322 (1967).

12 Hurvitz, D. and K. Hirschhorn : Suppression of in vitro lymphocyte responses by chloroquine. New Engl.J.Med. 273, 23-26 (1965).

13 Hersh, E.M. and J.J.Oppenheim : Inhibition of in vitro lymphocyte transformation during chemotherapy in man. Cancer Res. 27, 98 - 105 (1967).

14 Montgomery, J.R., South, M.A., Rawes, W.E., Melnick,J.L., Olsen, G.b., Dent, P.B. and R.A. Good : Vival inhibition of lymphocyte response to phytohemagglutinin. Science 157, 1068 - 1070 (1967).

15 Hirschhorn, K., Kolodny, R., Hashem, N. and f. Bach : Mitogenic action of phytohemagglutinin. Lancet 2, 305 - 306 (1963).

16 Witkowski, R. und K.M. Heine : Möglichkeiten und Bedeutung von Lymphozytenkulturen für Humangenetik und Medizin. Dtsch.Ges.wesen 22, 2380 - 2384 (1967).

17 Klima, R.: Grundlagen für eine Neuordnung der Hämatologie zellulärer Reaktionen im lymphatischen Apparat. Wien.Z.inn.Med. 33, 125-135 (1952).

18 Lennert, K.: Bildung und Differenzierung der Blutzellen, insbesondere der Lymphozyten. Verh.Dtsch.Ges.Path. 50, 163-166 (1966).

19 Gowans, J.L., Mc Gregor, D.D., Cowen, D.M. and C.E. Ford : Initiation of immune responses by small lymphocytes. Nature 196, 651 - 655 (1962).

20 Pearmain, G., Lycette, R.R. and P.H.Fitzgerald : Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet 1, 637 - 638 (1963).

21 Witkowski, R.: Ein neuer Lymphozytentest auf Kontakt- und bakterielle Allergie. Vortrag 23. Tagung der Derm. Ges. 1965 Derm.Wschr. 152, 1062 - 1063 (1966).

22 Heitmann, H.J.: Zur Methodik der Lymphozytenkultur als Allergietest. Hautarzt 18, 152 - 156 (1967 a).

23 Heitmann, H.J.: Vereinfachte Methodik der Lymphozytenkultur als Allergietest. Hautarzt 18, 459 - 461 (1967 b).

24 Heitmann, H.J. und H. Götz : Über " in vitro "-Reaktionen von Lymphozyten in Gegenwart von Trichophytin. Hautarzt 18, 23 - 24 (1967) .

25 Schulz, K.H. und E. Schöpf : Der Lymphozytentransformationstest in der Diagnostik der Arzneimittelallergie in: Raab, W.: Diagnose von Arzneimittelallergien, 1.Aufl. München-Berlin-Wien: Urban und Schwarzenberg 1968.

26 Braunsteiner, H.: Funktion der Leukozyten. Internist (Berl.) 3, 89-95 (1962).

27 Zeitz, St.J., van Arsdel, P.P. and D.K. Mc Clure : Specific response of human leucocytes to pollen antigen in tissue culture. J.Allergy 38, 321 - 329 (1966) .

28 Ricci, M., Passlaeva, A. and M. Ricci : Lymphocyte reaction in pollenosis. Lancet 2, 445 - 445 (1966).

29 Bain, B., Vas, M.R. and L. Lowenstein : The development of large immature mononuclear cells in mixed leucocyte cultures Blood 23, 108 - 116 (1964).

30 Tobiska, J.: Die Phytohämagglutinine. in: Hämatologie und Bluttransfusioswesen, 3. Aufl. Berlin: Akademieverlag 1964

31 Elves, M.W., Roath, S., Taylor, G.and M.C.G. Israels : The in vitro production of antibody by lymphocytes. Lancet 1, 1292 - 1293 (1963).

32 Bach, F.and K. Hirschhorn : Gammaglobulin production by human lymphocytes in vitro. Exp.Cell.Res. 32, 592 - 595 (1963).

33 Epstein, L.B. and F. Stohlman : RNA-synthesis in cultures of normal human peripheral blood. Blood 24, 69 - 75 (1964).

34 Jackson, J.F. and D. Killander : DNA-synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human leucocyte cultures treated with beta-mercaptoethanol. Exp.Cell.Res. 33, 458 - 467 (1964).

35 Böke, W.: Allergie. Dtsch.Ä. 2, 71 - 74 (1969).

36 Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, 1. Aufl. Stuttgart: Thieme 1968.

37 Letterer, E.: Morphologie der immunopathischen Reaktionen. Büchner, F.,Letterer,E.und E.Roulet: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, 1. Aufl. Stuttgart: Thieme 1968.

38 Letterer, E.: Allgemeine Morphologie der Immuno- und Autoimmunopathie. Vortrag 28. Tagung der Derm.Ges. 1968 (im Druck).

39 Morgan, J.F., Morton, H.J. and R.C. Parker:
Nutrition of animal cells in tissue culture.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 73, 1-8 (1950).

40 Kiistala, U. and K.K.
Mustakallio : In-vivo separation of epidermis by production of suction blisters.
Lancet 1, 1444 - 1445 (1964).

41 Kiistala, U. and K.K.
Mustakallio : Dermoepidermal separation with suction. Electronmicroscopic and histochemical study of initial events of blistering on human skin.
J. invest. Derm. 48, 466 - 477 (1967).

42 Merck, E. : Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden, 10. Aufl. Weinheim: Chemie-Verlag 1962.

43 Schönfeld, W. und
W. Schneider : Lehrbuch der Haut-und Geschlechtskrankheiten, 9. Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag 1965.

44 Riecke, E.: Lehrbuch der Haut-und Geschlechtskrankheiten, 9. Aufl. Stuttgart: Fischer-Verlag 1962.

45 Korting, G.W. : Therapie der Hautkrankheiten, 1. Aufl. Stuttgart: Schattauer-Verlag 1967.

46 Lever, W.F. : Differentialdiagnose zwischen Pemphigus vulgaris, bullösem Pemphigoid und Dermatitis herpetiformis Duhring.
Med. Klin. 62, 1173 - 1176 (1967).

47 Lever, W.F. : Pemphigus und Pemphigoid, Springfield: Thomas 1965.

48 Coons, A.H. und M.H. Kaplan : Localisation of antigen in tissue cells. J. exp. Med. 91, 1 - 13 (1950).

49 Beutner, E.H. and R.E. Jordon : Demonstration of skin autoantibodies in sera of pemphigus vulgari patients by indirect immunofluorescent staining. Proc.Soc.exp.Biol.and Med. 117,505-510 (1964).

50 Chorzelski, T.P., von Weiss, J.F. and W.F. Lever : Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. Arch. Derm.(Chicago) 93, 570 - 576 (1966).

51 Chorzelski, T.P., Jablonska, S. and M. Blaszyk : Autoantibodies in pemphigus. Acta derm. venereol. Sven Hellerström 47, 26 - 29 (1966).

52 Chorzelski, T.P., Jablonska, S., Blaszyk, M. and M. Jarzabek : Autoantibodies in pemphigoid. Dermatologica 136, 325 - 334 (1968).

53 Christophers, F., Braun-Falco, O. und F.P. Chorzelski: Uber das Verhalten von Autoantikörpern bei Patienten mit bullösem Pemphigoid. Hautarzt 18, 212 - 216 (1967).

54 Beutner, F.H., Sepulveda, M.R. and F.V. Barnett : Quantitative studies of immunfluorescent staining. In: Compendium of Contributions to First Conference on Immunodermatologic studies of Pemphigus and Pemphigoid. XII. Int. Congr. of Derm. Munich 1967.

55 Chorzelski,T.P., Biszysko,W., Dabrowski,J. and M.Jarzabek: Ultrastructural localisation of pemphigus autoantibodies. J. invest. Derm. 50, 36-40 (1968).

56 Braun-Falco,O.: Histochemische Befunde bei Pemphigus mit subepidermaler Blasenbildung, gleichzeitig ein Beitrag zur Pathogenese subepidermaler Blasenbildung. Arch. klin. exp. Derm. 211, 213-220(1960).

57 Grob,P.I. und T.M.Inderbitzin: Überempfindlichkeit gegen die eigene Haut. Schweiz. med. Wschr. 58, 207-209 (1968).

58 Chorzelski,T.P. and R.H.Cormane: "Bound" complement in the epidermis of patients with pemphigus vulgaris. Dermatologica 134, 463-466 (1967).

59 Rassner,G. und K.H.Wenig: Immunsuppressionstherapie bei Pemphigus vulgaris. Vortrag 28.Tagung der Derm. Ges. 1968 (im Druck).

60 Balo,J.: Ätiologie des Pemphigus.In: Pemphigus occupational Dermatosis due to chemical sensitization.
Published under the auspices of the Congress of the Hungarian Dermatological Society, Budapest 1965.

61 Melczer,N.: Beiträge zur Ätiologie des Pemphigus vulgaris. In: Pemphigus occupational Dermatosis due to chemical sensitization.
Published under the auspices of the Congress of the Hungarian Dermatological Society, Budapest 1965.

62 Scherbakov,I.M.: Virological studies in deseases of pemphigus group. In: Pemphigus occupational Dermatosis due to chemical sensitization.
Published under the auspices of the Congress of the Hungarian Dermatological Society, Budapest 1965.

63 Crosti,A., Gianotti,F., Hahn,E. et D.Bubola: Nos recherches virologiques sur les malades du proupe Pemphigus. In: Pemphigus occupational Dermatosis due to chemical sensitization.
Published under the auspices of the Congress of the Hungarian Dermatological Society, Budapest 1965.

64 Nasemann,T.: Zur Virusätiologie des Pemphigus.
In: Pemphigus occupational Dermatosis due to chemical sensitization.
Published under the auspices of the

Congress of the Hungarian Dermatological Society, Budapest 1965.

65 Crosti,A.: Orientierende klinische Erhebungen und virologische Untersuchungen zur einheitlichen Nosologie des E.e.m., der D.h.D., des Pemphigus und der Epidermolysis bullosa dystrophica. Hautarzt 17, 237-240 (1966).

66 Scheurlen,P.G., Pappas,A. und T.Ludwig: Stimulation der Blutlymphozyten durch PHA bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose. Klin. Wschr. 46, 483-490 (1968).

67 Palacios,I.J., M.D. and W.Kenneth-Blaylock: The response of lymphocytes in tissue culture to normal and deseased skin extracts. J. invest. Derm. 49, 214-217 (1967).

68 Hashem,N., Sedlis,E., Hirschhorn,K. and L.E.Holt: Infantile eczema: Evidence of autoimmunity to human skin. Lancet 2, 269-270 (1963).

69 Johnson,G.J. and P.S.Russel: Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium. Nature (Lond.) 208, 343-345 (1965).

70 Hirschhorn,K., Bach,F., Roselyn,L., Kolodny,J., Firschein,L. and N.Hashem: Immune response and Mitosis of human

peripheral blood lymphocytes in vitro.
Science 142, 1185-1187 (1963).

71 Christophers,E.: Die Bedeutung von Autoantikörpern bei blasenbildenden Dermatosen.
Vortrag 28.Tagung der Derm. Ges. 1968 (im Druck).

72 Whitfield,A.: Some points in the etiology of skin deseases.
Lancet 2, 122-127 (1921).

Herrn Professor Dr. med. H.Tronnier
möchte ich für die Überlassung des
Themas sowie seine wertvollen Ratschläge bei der Anfertigung der Arbeit meinen besten Dank aussprechen.
Allen Ärzten, insbesondere Herrn Dr.med.
M. Reinhard, Schwestern und Angestellten der Klinik danke ich für ihre oft
bewiesene verständnisvolle Hilfe.

Herrn Professor Dr. med. W. Schneider
danke ich für die Übernahme des Koreferates und die mir in seiner Klinik
gebotene Arbeitsmöglichkeit.

Lebenslauf

Als einziger Sohn des Maschinenschlossers Josef Lang und dessen Ehefrau Eva, geborene Wendler, wurde ich, Stefan Lang, am 13. Januar 1941 in Kunbaja/Ungarn geboren.

Nach der Grundschule in Schönebach, Kreis Augsburg besuchte ich das humanistische Gymnasium in St. Ottilien/Obb. und in Günzburg/Donau. Im Juni 1961 legte ich in Günzburg die Reifeprüfung ab.

Im WS 1961/62 begann ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg das Studium der Medizin. 1964 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Während der klinischen Semester studierte ich in Wien und Würzburg. Im Juli 1967 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen in Würzburg ab.